ฤทธิ์ยับยั้ง *Alternaria brassicicola* ของราเอนโดไฟท์ TH121 ที่แยกได้จากใบโพทะเล

Antifungal Activity of Endophytic Fungi TH121 Isolated from *Thespesia populnea* Against *Alternaria brassicicola*

จิราภรณ์ ธนากุลปกรณ์ และอภิรดี ปิลันธนภาคย์*

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

Jiraporn Tanakulpakorn and Apiradee Pilantanapak*

Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Mueang, Chonburi 20131

Rattanaporn Srivibool

Institute of Marine Science, Faculty of Science, Burapha University, Mueang, Chonburi 20131

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟท์ TH121 พบว่าอยู่ในกลุ่ม coelomycete การศึกษาความเค็มของอาหารที่เหมาะสม ระหว่าง 0-30 ppt (ส่วนในพันส่วน) และผลของอาหารเหลว 5 ชนิด คือ potato dextrose broth (PDB), potato dextrose broth ที่ลดสารอาหารลงครึ่งหนึ่ง (0.5xPDB), Sabouraud dextrose broth (SDB), yeast malt broth (YMB) และ low nutrient broth (LNB) ในการหมักรา TH121 เพื่อให้สร้างสารยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* พบฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุดเมื่อหมักรา TH121 ในอาหาร 0.5xPDB ที่เตรียมจากน้ำกลั่น (0.5xPDB/DW) โดยที่เมื่อนำสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่สกัดได้จากน้ำหมัก 0.5xPDB/DW ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และละลายในสารละลาย 50 % DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ *A. brassicicola* ด้วยวิธี disc diffusion พบระยะยับยั้งสูงสุด (Inhibition distance) 0.46 เซนติเมตร หลังจากบ่มนาน 3 วัน

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟท์ ใบโพทะเล *Alternaria brassicicola*

Abstract

Based on morphological study, the endophytic fungus TH121 can be classified as coelomycete. Optimization study of salinity (0-30 part per thousand, ppt) and 5 broth media; potato dextrose broth (PDB), 0.5 fold concentrated potato dextrose broth (0.5xPDB), Sabouraud dextrose broth (SDB),

***Corresponding author:** apiradee@buu.ac.th* *DOI:10.14456/tjst.2012.5*

yeast malt broth (YMB) and low nutrient broth (LNB), for high production of bioactive compounds against plant pathogenic fungus *A. brassicicola*. The results revealed that the strongest activity was obtained after fermention in 0.5 fold concentrated potato dextrose broth in distilled water (0.5xPDB/DW). When twenty microlitters of extract from 100 ml of 0.5xPDB/DW culture filtrate was dissolved in 1 ml of 50 % DMSO and tested for antifungal activity by disc diffusion method. The maximum inhibition distance of 0.46 cm was observed after 3 days of incubation.

Keywords: endophytic fungi, *Thespesia populnea*, *Alternaria brassicicola*

1. คำนำ

ราเอนโดไฟท์เป็นราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืช และสามารถเจริญได้ดี โดยไม่ทำให้เกิดโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ผิดปกติแก่พืชชนิดนั้น ๆ (Petrini, 1991) รากลุ่มนี้มีความสำคัญต่อพืชที่อาศัยทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยจะช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานศัตรูพืชต่าง ๆ เพิ่มความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าพืชที่ไม่มีเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ ราเอนโดไฟท์หลายชนิดสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพต้านจุลินทรีย์หลายชนิด รวมทั้งต้านราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Park *et al*., 2005; Xu *et al*., 2009; Chaeprasert *et al*., 2010) ทั้งยังมีอิทธิพลในแง่ความหลากหลายทางชีวภาพ เนื่องจากสามารถพบราเอนโดไฟท์ได้ในพืชตระกูลต่าง ๆ เป็นจำนวนมากรวมทั้งพืชชายเลน คุณสมบัติเหล่านี้ของราเอนโดไฟท์เป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านเกษตรกรรม (Saikkonen, 2007) จึงมีการศึกษาวิจัยราเอนโดไฟท์กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตและส่งออกผัก ผลไม้ ไปยังประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกแต่ต้องประสบปัญหาจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืชประเภทต่าง ๆ ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืช พบว่าราจัดเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำความเสียหายให้แก่พืชผลมากที่สุด มีรามากกว่า 8,000 ชนิด ที่เป็นสาเหตุโรคพืช และมีพืชชั้นสูงรวมถึงพืชผลทางการเกษตรเกิดโรคเนื่องจากราไม่น้อยกว่า 100,000 โรค ราอะนามอร์พ (anamorphic fungi) เป็นรากลุ่มหนึ่งที่มีรายงานการเป็นสาเหตุโรคพืชในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้งในประเทศไทยและประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก รา *Alternaria* spp. เป็นราเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งทั้งของไทยและต่างประเทศ โดยก่อโรคใบจุดดำในพืชตระกูลกะหล่ำ (Intana *et al.,* 2005; Muto *et al.,* 2006) โรคพืชเหล่านี้ทำความเสียหายต่อทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตเป็นอย่างมาก ส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีจำนวนน้อยไม่คุ้มกับการลงทุน และต้องมีการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันเชื้อราก่อโรคเหล่านี้ สารเคมีที่ใช้อาจส่งผลเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ต่อมนุษย์และสัตว์ (นิตยา, 2552)

การควบคุมโรคพืชทางชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ควบคุมโรคพืชได้ และปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมี ซึ่งอาจทำได้โดยใช้ราที่ไม่ก่อโรคในการควบคุมราปรปักษ์ ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชโดยตรง หรืออาจใช้สารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำลายราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Hostettmann and Marston, 1994; Intana *et al.,* 2005; Xie *et al.,* 2008) การใช้สารสกัดจากรายับยั้งราที่เป็นสาเหตุโรคพืช มีรายงานไว้น้อยมากเมื่อเทียบกับวิธีแรก แต่ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา มีผู้ให้ความสนใจกันมากขึ้น เนื่องจากพบ

ว่าราเอนโดไฟท์ สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด (Park *et al.,* 2005)

โพทะเล (*Thespesia populnea*) เป็นพืชเด่นชนิดหนึ่งที่พบเป็นไม้พื้นล่างในป่าชายเลน ลักษณะเด่นที่เห็นชัดคือมีใบคล้ายใบโพธิ์ ราเอนโดไฟท์ในโพทะเลและพืชชายเลนสามารถจัดเป็นราทะเลประเภทหนึ่ง ที่เรียกว่า marine-derived fungi (Miller, 2000; Proksch *et al.,* 2010) ที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาราเอนโดไฟท์และคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียของราเอนโดไฟท์ในโพทะเลและพืชชายเลนอื่น ๆ เพียงเล็กน้อย แต่ยังไม่มีรายงานการยับยั้งราก่อโรคพืช

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของราเอนโดไฟท์ในใบโพทะเล ในการยับยั้งการเจริญ *A. brassicicola* รวมทั้งศึกษาผลของความเค็มและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลมากต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพของราทะเล

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

2.1 ตัวอย่างและแหล่งเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างใบโพทะเลที่มีสภาพดีจากโพทะเล 3 ต้น ต้นละ 5 ใบ จากป่าชายเลนเขตน้ำทะเลท่วมถึง บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เดือนตุลาคม 2553

2.2 ราสาเหตุโรคพืช

Alternalia brassicicola DOAC 0436 ก่อโรคใบจุดในพืชตระกูลกะหล่ำ จัดซื้อจากกรมวิชาการเกษตร

2.3 อาหารที่ใช้

อาหารที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อ จำแนกชนิด และทดสอบผลยับยั้งการเจริญ ได้แก่ water agar (WA), potato dextrose agar (PDA) และ corn meal agar (CMA) อาหารเหลวสำหรับการหมัก ได้แก่ potato dextrose broth (PDB), potato dextrose broth ที่ลดสารอาหารลงครึ่งหนึ่ง (0.5xPDB), Sabouraud dextrose broth (SDB), yeast malt broth (YMB) และ low nutrient broth (LNB)

2.4 การแยกและจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา

แยกราเอนโดไฟท์โดยวิธีที่ดัดแปลงจากเลขา และคณะ (2554) โดยตัดใบไม้ส่วนที่สมบูรณ์ จำนวน 5 ชิ้น ขนาด 5x5 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย 70 % ethanol นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่ในสารละลาย 10 % chlorox นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 รอบ รอบละ 1 นาที ซับให้แห้งบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ นำใบไม้ที่ฆ่าเชื้อแล้ว มาวางบนจานอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน ตัดวุ้นส่วนที่มีเส้นใยราเจริญจากส่วนของใบไม้ที่แตกต่างกันมาเลี้ยงซ้ำบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ตัดวุ้น ส่วนที่มีลักษณะการเจริญของราซึ่งแสดงลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน มาเลี้ยงในหลอดเกลียว เก็บเชื้อเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะเส้นใย ชนิด และลักษณะสปอร์ ความสามารถในการสร้างสปอร์และการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อื่น ๆ บนจานอาหาร จัดจำแนกราโดยใช้คู่มือจัดจำแนกราทั่วไปและราทะเล (Barnett and Hunter, 1998; Kohlmeyer and Volkmann Kohlmeyer, 1991; Jones *et al*., 2009)

2.5 การเตรียมหัวเชื้อและสารสกัด

ใช้ cork borer เจาะบริเวณขอบรอบนอกของโคโลนีราเอนโดไฟท์ มาเลี้ยงซ้ำบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน

ใช้ cork borer เจาะบริเวณขอบรอบนอกของโคโลนี ประมาณ 5 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลวที่เหมาะสม ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร 3 ขวด บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที (ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง เพื่อแยกส่วนของน้ำหมักและเส้นใยราออกจากกัน นำน้ำหมักของราที่ได้ มาสกัดด้วยสารละลาย ethyl acetate 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำส่วน ethyl acetate ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator จากนั้นละลายสารสกัดที่ได้ด้วย 50 % dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.6 ศึกษาความเค็มและชนิดอาหารที่เหมาะสมในการสร้างสารออกฤทธิ์

นำราเอนโดไฟท์ TH121 มาหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น และน้ำที่ผสมน้ำทะเล ให้มีค่าความเค็มต่าง ๆ กัน อย่างละ 3 ฟลาสก์ (ตารางที่ 1) เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน สกัดสารจากอาหารแต่ละฟลาสก์ตามวิธีที่แสดงข้างต้น นำสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละฟลาสก์ (น้ำหมัก) ที่ผ่านการระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator ไปละลายด้วยสารละลาย 50 % DMSO และทดสอบการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* โดยการวางแผ่น disc ที่มีสารสกัดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารราโรคพืชอายุ 3 วัน ห่างจากขอบโคโลนี 1 เซนติเมตร จากนั้นบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ ห้อง บันทึกผลระยะยับยั้ง (Inhibition distance) เทียบกับสารละลาย 50 % DMSO (ทำ 3 ซ้ำ) เลือกค่าความเค็มอาหารที่ให้ผลดีที่สุด มาใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงรา 5 ชนิด (ตารางที่ 1) ศึกษาผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ของราในอาหารเช่นเดียวกับวิธีที่กล่าวมาข้างต้น บันทึกผลเป็นระยะยับยั้ง (ทำ 3 ซ้ำ)

Table 1 Fermentation conditions for optimization of TH121

Salinity (ppt)	Media	Fermentation period (day)
0, 10, 15, 20, 30	0.5xPDB, PDB, SDB, YMB, LNB	4

0.5xPDB = half concentration of PDB,
PDB = potato dextrose broth,
SDB = Sabouraud dextrose broth,
YMB = yeast malt broth,
LNB = low nutrient broth

2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ในแต่ละปัจจัยมาคัดเลือกระดับปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านรา *A. brassicicola* ด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05 (P=0.05) ถ้าปัจจัยดังกล่าวมีนัยสำคัญแล้วจึงวิเคราะห์ข้อมูลต่อด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (P=0.05) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS เพื่อคัดเลือกระดับปัจจัยที่เหมาะสมต่อการทดลองขั้นถัดไป

2.8 ศึกษารูปแบบสารองค์ประกอบในสารสกัดด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC)

หยดสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.5 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC สำเร็จรูป silica gel $60F_{254}$ (Merk) ที่ตัดให้มีขนาด 5x7 เซนติเมตร ให้จุดสารสกัดอยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่น 0.5 เซนติเมตร วางผึ่งให้สารแห้ง นำแผ่น TLC วางใน

ภาชนะปิดสนิท ภายในบรรจุสารละลาย chloroform และ methanol ในอัตราส่วน 9.5:0.5 ตรวจสอบสารประกอบที่แยกออกจากกันใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3. ผลการทดลอง

3.1 การแยกและจัดจำแนกรา TH 121

แยกรา TH121 ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์ที่ได้จากใบโพทะเลและมีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* ได้บนอาหารแข็ง PDA และ SDA ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น มาเลี้ยงเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีเส้นใยอ่อนสีขาวสานกันแน่น และด้านหลังโคโลนีเป็นสีเหลือง อัตราการเจริญช้า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2.9 เซนติเมตร ส่วนบนอาหาร CMA มีการสร้างพิคนิเดีย (pycnidia) สีน้ำตาล ฝังในเนื้อวุ้น เมื่อตรวจสอบ ลักษณะราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยละเอียดมีผนังกั้น สร้างสปอร์รูปหยดน้ำขนาดเล็ก ในปริมาณน้อยมาก (1-2 สปอร์) จึงสามารถจัดจำแนกได้เพียงในเบื้องต้นว่าเป็นรากลุ่ม coelomycete

3.2 การศึกษาการยับยั้ง *A. brassicicola* ของสารสกัดหยาบ

การทดสอบสารสกัดสารจากน้ำหมักรา TH121 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ในอาหาร 0.5xPDB ที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น (0 ppt) และน้ำทะเลที่ปรับให้มีค่าความเค็ม 10, 15, 20 และ 30 ppt พบว่าราTH121 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเค็มระหว่าง 0-15 ppt สร้างสารยับยั้ง *A. brassicicola* ได้ โดยที่น้ำกลั่นเหมาะสมต่อการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงรา เพื่อเตรียมสารสกัดยับยั้งราสาเหตุโรคพืชมากที่สุด เมื่อทดสอบสารสกัดจากอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น พบว่ามีระยะยับยั้ง 0.27 เซนติเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสารสกัดที่เตรียมได้จากน้ำทะเลที่ปรับให้มีค่าความเค็ม 10 ppt และ 15 ppt ซึ่งให้ผลระยะยับยั้งเท่ากันคือ 0.13 เซนติเมตร (ตารางที่ 2) จากนั้นเลือกน้ำกลั่นซึ่งให้ผลการยับยั้ง *A. brassicicola* ดีที่สุดมาใช้ในการเตรียมอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ได้อาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งมากยิ่งขึ้น

Table 2 Antifungal activity against *A. brassicicola* of the extracts from TH121 culture filtrate after fermentation in PDB with different salinity

Salinity	Inhibition distance (cm)
0 ppt	0.27 ± 0.05^{a}
10 ppt	0.13 ± 0.05^{b}
15 ppt	0.13 ± 0.05^{b}
20 ppt	0^{c}
30 ppt	0^{c}

ppt = part per thousand

Means of 9 replicates

Means followed by different letters differ significantly at p = 0.05 (DMRT)

การทดสอบหาอาหารที่เหมาะสมและเตรียมจากน้ำกลั่น จำนวน 5 ชนิด คือ PDB, 0.5xPDB, SDB, YMB และ LNB ที่นำมาเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อให้สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช (ตารางที่ 3) ซึ่งจะเห็นว่า 0.5xPDB และ PDB เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ TH121 เพื่อให้สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ (รูปที่ 1) ขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งของสารที่สกัดได้จากราที่เลี้ยงใน YMB อยู่ในระดับปานกลาง โดยมีระยะยับยั้ง 0.46 เซนติเมตร 0.37 เซนติเมตร และ 0.25 เซนติเมตร ตามลำดับ

Table 3 Antifungal activity against *A. brassicicola* of the extracts from TH121 culture filtrate after fermentation in different type of media

Media	Inhibition distance (cm)
0.5xPDB	0.46 ± 0.08[a]
PDB	0.37 ± 0.09[a]
SDB	0.05 ± 0.05[c]
YMB	0.25 ± 0.08[b]
LNB	0.16 ± 0.06[b]

ppt = part per thousand

Means of 9 replicates

Means followed by different letters differ significantly at p = 0.05 (DMRT)

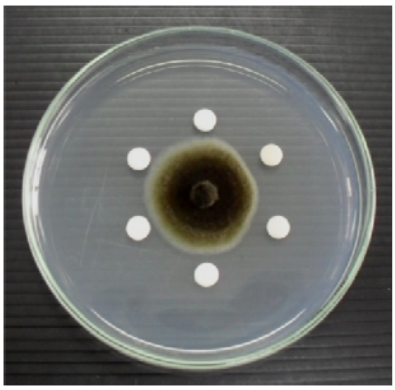

Figure 1 Antifungal activity against *A. brassicicola* of the extracts from TH121 culture filtrate after fermentation in different types of media; 1: potato dextrose broth (PDB), 2: half concentration of PDB (0.5xPDB), 3: yeast malt broth (YMB), 4: low nutrient broth (LNB), 5: Sabouraud dextrose broth (SDB), CT-: disc soaked with 50 % DMSO as negative control

3.3 การศึกษาสารองค์ประกอบโดยวิธี thin layer chromatography

การวิเคราะห์ชนิดสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบที่ได้จากการหมักราเอนโดไฟท์ TH121 ในอาหาร PDB ที่มีค่าความเค็มต่าง ๆ กัน พบว่า spot ของสารที่วิเคราะห์ได้ยังไม่แตกต่างกันชัดเจน สารสกัดหยาบทั้งหมดไม่ว่าจะสกัดมาจากราที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเค็มเท่าใด ประกอบด้วยสารองค์ประกอบ 2 ชนิด ที่มีค่า Rf ต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่หลังจากนำราเอนโดไฟท์ไปเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมจากน้ำกลั่น สารสกัดจากราที่เลี้ยงในอาหารต่างกันให้รูปแบบสารองค์ประกอบต่างกัน โดยสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ TH121 ที่เลี้ยงใน PDB และ YMB พบสารองค์ประกอบกลุ่มที่ 2 และ 3 เป็นสารเด่น (ภาพที่ 2)

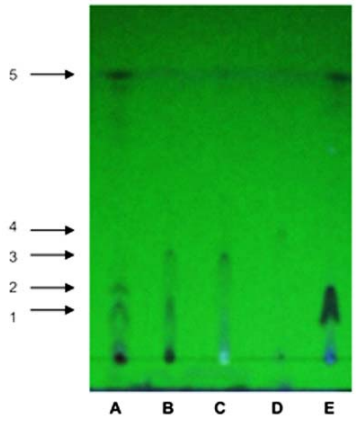

Figure 2 Spectrum of compounds on silica gel $60F_{254}$ of the extracts extract from TH121 cultured filtrate after fermentation in different types of media; A: half concentration of potato dextrose broth (0.5xPDB), B: potato dextrose broth (PDB), C: yeast malt broth (YMB), D: low nutrient broth (LNB), E: Sabouraud dextrose broth (SDB)

4. อภิปรายผลการทดลอง

เนื่องจาก TH121 เป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบโพทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* บนอาหารแข็งดีที่สุด จึงได้นำสายพันธุ์บริสุทธิ์มาจัดจำแนก แต่จากความสามารถในการสร้างสปอร์ที่ไม่ดีนัก และลักษณะสปอร์ขนาดเล็กในพิคนิเดีย (pycnedia) บนอาหาร PDA ทำให้สามารถจำแนกในเบื้องต้นเป็นเพียงรากลุ่ม coelomycete การจัดจำแนกถึงระดับสกุลหรือระดับชนิด อาจต้องใช้การศึกษาทางพันธุศาสตร์ร่วมด้วย มีรายงานว่าส่วนใหญ่ของราเอนโดไฟท์ในพืชส่วนใหญ่รวมทั้งโพทะเลเป็น mycelia sterilia (Kokaew *et al.* 2008; Chaeprasert *et al*., 2010)

A. brassicicola เป็นเชื้อที่เจริญเร็ว สร้างสปอร์ง่าย ทำให้การควบคุมการเจริญทำได้ยากกว่าราที่เป็นสาเหตุโรคพืชชนิดอื่น และรายงานการควบคุม *A. brassicicola* ในระยะที่ผ่านมามีไม่มากนัก โดยมีรายงานว่ารา *Trichoderma virens* จำนวน 13 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของราสายพันธุ์ก่อโรคได้ และเมื่อทดสอบสารสกัดจาก *T. virens* กับสปอร์ของ *A. brassicicola* พบการงอกของสปอร์ *A. brassicicola* มีเพียง 9.4 % เมื่อเทียบกับ 98.5 % ของชุดควบคุม

มีรายงานในราทะเลกลุ่ม obligate marine fungi พบว่าความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิขึ้นกับความเค็มน้ำทะเลที่แตกต่างกัน และความเค็มเป็นปัจจัยสำคัญต่อการสร้างสารเมตาบอไลท์ในราทะเลกลุ่มนี้ (Bugni and Ireland, 2004) ดังนั้นการเลี้ยงราเอนโดไฟท์ของพืชชายเลนซึ่งเป็นราทะเลกลุ่ม marine-derived fungi ในห้องปฏิบัติการความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมาะสมอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิราเอนโดไฟท์ของพืชชายเลน ซึ่งต้องอาศัยอยู่ในใบพืชที่มีความเค็มน้ำในใบสูง ลดต่ำลง นอกจากความเค็มแล้ว ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงราเอนโดไฟท์ของพืชชายเลน น่าจะมีความสำคัญอย่างมากต่อการสร้างสารยับยั้งรา จากสภาพธรรมชาติที่พบราเอนโดไฟท์ชนิดเด่นหลายชนิดต่างกันในพืชต่างชนิดกัน (Kumaresan and Suryanarayanan, 2001) การศึกษานี้คณะผู้วิจัยจึงเลือกสภาวะความเค็มอาหารและชนิดอาหาร ในการศึกษาเบื้องต้น

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่นำมาศึกษาให้ผลในการยับยั้งรา *A. brassicicola* ได้ดีที่สุดในอาหารที่เตรียมจากน้ำกลั่นที่ไม่ได้ผสมน้ำทะเล เมื่อความเค็มในอาหาร >15 ppt ราเอนโดไฟท์ TH121 ไม่สร้างสารยับยั้ง *A. brassicicola* คุณสมบัตินี้สอดคล้องกับรายงานอื่น ๆ ที่ผ่านมาในราทะเลกลุ่ม obligate marine fungi ซึ่งส่วนใหญ่สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ดีในน้ำกลั่น เนื่องจากไม่ต้องสูญเสียพลังงานในการสร้างสารเพื่อปกป้องตนเองจากความเค็ม (Bugni and Ireland, 2004) และเป็นไปได้ว่าสมมุติฐานนี้สามารถนำมาใช้กับราเอนโดไฟท์ในพืชชายเลนซึ่งถูกจัดเป็นราทะเลประเภทหนึ่งได้

ความสมบูรณ์ของสารอาหารมีความสำคัญอย่างมาก ต่อการสร้างสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราเอนโดไฟท์ TH121 จากการศึกษาพบว่าสารอาหารที่มีอย่างสมบูรณ์ใน PDB, YMB และ SDB จะช่วยให้รา TH121 สร้างสารยับยั้ง *A. brassicicola* ได้ดี ส่วนอาหาร LNB ซึ่งมีสารอาหารน้อยมากคือมีแหล่งคาร์บอน (dextrose) 2 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน (yeast extract และ malt extract) 0.3 กรัมต่อลิตร (Motti *et al*., 2007) ให้ผลต่างออกไปอย่างชัดเจน นอกจากความสมบูรณ์ของสารอาหารแล้ว ชนิดของสารอาหารอาจมีส่วนสำคัญเช่นเดียวกัน ซึ่งถ้าพิจารณาองค์ประกอบของอาหาร PDB และ SDB ในด้านแหล่งไนโตรเจนและแหล่ง

คาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะพบว่ามีองค์ประกอบต่างกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตเมตาบอไลท์ของรา (Li *at al*., 2007) ดังนั้นเป็นไปได้ว่า ผลของสารสกัดที่ต่างกันของ TH121 ที่เลี้ยงในอาหารต่างชนิดกัน ดังเช่นกรณีของ PDB และ SDB น่าจะมาจากความแตกต่างของสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกเหนือจากคุณสมบัติจำเพาะของราเอนโดไฟท์เองหรือปัจจัยอื่น ๆ ที่ยังไม่ได้ศึกษาในที่นี้

การวิเคราะห์รูปแบบสารองค์ประกอบหลังจากปรับค่าความเค็มของอาหาร PDB ที่ใช้เลี้ยงราเอนโดไฟท์ ยังไม่พบว่าราเอนโดไฟท์สร้างสารที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด และสารประกอบชนิดที่ 2 และชนิดที่ 3 อาจเป็นสารชนิดเดียวกัน เนื่องจากอัตราการเคลื่อนที่ในแผ่น TLC ใกล้เคียงกันมาก แต่การทำ TLC ของสารสกัดจากเอนโด-ไฟท์ เมื่อใช้อาหารชนิดต่าง ๆ กัน ที่ปรับค่าความเค็มให้เหมาะสมแล้ว แสดงให้เห็นรูปแบบของสารองค์ประกอบที่เปลี่ยนไปขึ้นกับชนิดอาหารที่ใช้เลี้ยงราTH121 แสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมเมื่อคำนึงถึงปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย เริ่มส่งผลต่อความสามารถในการสร้างสารยับยั้งรา *A. brassicicola* ในสารสกัดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟท์ TH121 ที่เหมาะสม พบสารองค์ประกอบที่แตกต่าง หรือปริมาณที่ต่างจากที่พบในสารสกัดที่เตรียมจากอาหารที่ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะสารองค์ประกอบชนิดที่ 2 และชนิดที่ 3 เป็นไปได้ว่าสารประกอบเหล่านี้เป็นสารที่มีบทบาทในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช สารสกัดที่ยับยั้งได้ น่าจะเป็นสารในกลุ่มไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย เนื่องจากเคลื่อนในแผ่น silica gel ได้ไม่ดีนัก ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ได้จากราเอนโดไฟท์ทั่วไป เช่น deoxytetrahydrobostrycin, aloesol และ deoxybostrycin (Kjer, 2009)

5. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่าราเอนโดไฟท์ TH121 เป็นราในกลุ่ม coelomycete การศึกษาสภาวะที่ TH121 สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* ดีที่สุดในการศึกษานี้ มุ่งเน้นถึงค่าความเค็มของอาหาร และชนิดของอาหารเหลวที่แตกต่างกัน โดยในเบื้องต้นทำการศึกษาผลของความเค็มในอาหาร potato dextrose broth พบว่าอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นให้ผลดีที่สุด และเมื่อนำน้ำกลั่นมาทดลองเตรียมอาหารหมักรา TH121 5 ชนิด คือ potato dextrose broth (PDB), potato dextrose broth ที่ลดสารอาหารลงครึ่งหนึ่ง (0.5x PDB), Sabouraud dextrose broth (SDB), yeast malt broth (YMB) และ low nutrient broth (LNB) พบว่าอาหาร 0.5xPDB ให้ผลดีที่สุด โดยที่สารสกัดที่เตรียมได้จากการหมักรา TH121 ในอาหาร 0.5xPDB ที่เตรียมจากน้ำกลั่น ให้ค่าระยะยับยั้งสูงสุด

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้จัดสรรเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2554 สนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และคุณสุติรัตน์ ปุ่นประเสริฐ นักวิทยาศาสตร์โครงการบัณฑิตศึกษาที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์บางส่วน ขอขอบคุณ คุณสุพรรษา พันธุ์ธรรม

นักศึกษาปริญญาตรี ผู้ช่วยวิจัยในโครงการ ตลอดจนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานวิจัย

7. เอกสารอ้างอิง

นิตยา โนคำ, 2552, การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยโดยเชื้อราเอนโดไฟท์, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

เลขา มาโนช, กัญญา เจริญไทย, คนึงนิจ บุศราคำ, พรพิมล อธิปัญญาคม, อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ อรอุมา เจียมจิตต์, 2554, เชื้อราโรคพืช endophyte และราดินในประเทศไทย, น. 502-510, ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B., 1998, Illustrated genera of imperfect fungi, 4th Ed, APS Press, Minnsota.

Bugni, T. and Ireland C.M., 2004, Marine-derived fungi: A chemically and biologically diverse group of microorganisms, Nat. Prod. Rep. 21: 143-163.

Chaeprasert, S., Piapukiew, J., Whalley, A. and Sihanonth, P., 2010, Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand: Their antimicrobial and anticancer poteincial, Bot. Mar. 53: 555-564.

Hostettmann, K. and Marston, A., 1994, Search for new antifungal compounds from higher plants, Pure App. Chem. 66: 2231-2234.

Intana, W., Suwanno, T. and Chamswarng, C., 2005, Use of antifungal metabolite from *Trichoderma virens* for controlling Chinese kale leaf spots caused by *Alternaria brassicicola,* Walailuk J. Sci. Tech. 2: 1-9.

Jones, E.B.G., Sakayaroj, J., Suetrong, S., Somrithipool, S. and Pang, K.L., 2009, Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota, Fung. Diver. 35: 1-187.

Kjer, J., 2009, New natural products from endophytic fungi from mangrove plants structure elucidation and biological screening, Biores. Tech. 2: 3-35.

Kohlmeyer, J. and Volkmann-Kohlmeyer, B., 1991, Illustrated key to the filamentous higher marine fungi, Bot. Mar. 34: 1-61.

Kokaew, J., Manoch, L., Visarathaninth, N., Singburadom, N. and Warapong, J., 2008, Diversity of endophytic fungi in wild plant from Phu Luang wild life sanctuary and Samasarn island. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.

Kumaresan, V. and Suryanarayanan, T.S., 2001, Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community, Mycol. Res. 105: 1388-1391.

Li, L., Qiao, B. and Yuan, Y., 2007, Nitrogen sources affect Streptolydigin production and related secondary metabolites distribution of *Streptomyces lydicus* AS 4.2501, Chin. J. Eng. 15: 403-410.

Lin, W., Li, L., Fu, H., Sattler, I., Huang, X. and Grabley, S., 2005, New cyclopentenone derivatives from an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from the mangrove plant

Aegiceras comiculatum, J. Antibiot. 58: 594-598.

Miller, J.D., 2000, Screening for secondary metabolites, pp. 158-171, In Hyde, K.D. and Pointing, S.B., Marine Mycology: A Practical Approach, Fungal Diversity Research Series I, Fungal Diversity Press, Hong Kong.

Motti, C.A., Bourne, D.G., Burnell, J.N., Dcyle, J.R., Haines, D.S., Liptrot, C.H., Liewellyn, L.E., Ludke, S., Muirhead, A. and Tapiolas, D.M., 2007, Screening marine fungi for inhibitors of the C4 plant enzymes pyruvate phosphate dikinase: Unguinol as a potential novel herbicide candidate, App. Env. Microbiol. 73: 1921-1927.

Muto, M., Mulabagal, V., Huang, H.C., Takahashi, H., Tsay, H.S. and Huang, J. W., 2006, Toxicity of black nightshade (*Solanum nigrum*) extracts on *Alternaria brassicicola*, causal agent of black leaf spot of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*), Phytopathology 154: 45-50.

Park, J.H., Choi, G.J., Lee, H.B., Kim, K.M., Jung, H.S., Lee, S.W., Jang, K.S. and Cho, K.Y., 2005, Griseofulvin from *Xylaria* sp. Strain F0010, and endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi, J. Microbiol. Biotechnol. 15: 112-117.

Petrini, O., 1991, Fungal endophytes of tree leaves, pp.179-197, In Andrews, J. and Hirano, S.S., Microbial Ecology of Leaves, Springer-Verlag, New York.

Proksch, P., Putz, A., Ortlepp, S., Kjer, J. and Bayer, M., 2010, Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes, Phytochem. Rev. 9:75-489.

Saikkonen, K., 2007, Forest structure and fungal endophytes, Fung. Biol. Rev. 21: 67-74.

Xie, L.W., Jiang, S.M., Zhu, H.H., Sun, W., Ouyag, Y.C., Dai, S.K. and Xiang, L., 2008, Potential inhibitors against *Sclerotinia sclerotium* produced by the fungus *Myrothecium* sp. associated with the marine sponge *Axinella* sp., Eur. J. Plant Pathol. 122: 571-578.

Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, H., Edrada, R., Müller, Werner E.G., Bayer, M., Lin, W., Wu, J. and Proksch, P., 2009, *Cytosporones, coumarins*, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*, Bioorg. Med. Chem. 17: 7362-7367.